



ESPAÑA

|    |          |                                     |    |
|----|----------|-------------------------------------|----|
| ES | 11<br>21 | NUMERO<br>485.047                   | AI |
|    | 22       | FECHA DE PRESENTACION<br>16-10-1979 |    |

PATENTE DE INVENCION

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente solicitud y en el contenido de la Memoria adjunta.

|                                                                                                                         |                                                                                                               |                          |                             |    |                                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|----|-----------------------------------|
| 83<br>81                                                                                                                | PRIORIDADES<br>NUMERO                                                                                         | 82<br>FECHA              | 83<br>PAIS                  |    |                                   |
|                                                                                                                         | 951.948<br>951.949                                                                                            | 16-10-1978<br>16-10-1978 | EE.UU.<br>EE.UU.            |    |                                   |
| 87                                                                                                                      | FECHA DE PUBLICIDAD                                                                                           | 81                       | CLASIFICACION INTERNACIONAL | 82 | PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA |
| 84                                                                                                                      | TITULO DE LA INVENCION<br><br>"PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR UNA MATRIZ ORGANICA-INORGANICA"<br><br>Box J 31/00 |                          |                             |    |                                   |
| 71                                                                                                                      | SOLICITANTE (S)<br><br>UOP INC.<br><br>(Case 1862)                                                            |                          |                             |    |                                   |
| DOMICILIO DEL SOLICITANTE<br><br>Ter. UOP Plaza, Algonquin & Mt. Prospect Roads, Des Plaines,<br>Illinois 60016, EE.UU. |                                                                                                               |                          |                             |    |                                   |
| 72                                                                                                                      | INVENTOR (ES)<br><br>RONALD PAUL ROHRBACH y JOSEPH LEVY                                                       |                          |                             |    |                                   |
| 73                                                                                                                      | TITULAR (S)                                                                                                   |                          |                             |    |                                   |
| 74                                                                                                                      | REPRESENTANTE<br><br>DON OSCAR DE ELGARURU FERNANDEZ<br><br>(P.-73.234)                                       |                          |                             |    |                                   |

Jga

POOR  
QUALITY

1                   Es sabido que las enzimas, que son de naturaleza  
proteínica y que comúnmente son solubles en agua, compren-  
den catalizadores biológicos que sirven para regular numero-  
sas y variadas reacciones químicas, que tienen lugar en los  
5 organismos vivos. Las enzimas pueden aislarse también y uti-  
lizarse en aplicaciones analíticas, médicas e industriales.  
Por ejemplo, encuentran uso en aplicaciones industriales de  
preparación de productos alimenticios, tales como queso o  
pan, siendo asimismo utilizados en la preparación de bebidas  
10 alcohólicas. Algunos usos específicos en la industria pue-  
den encontrarse en los usos de enzimas, tales como en la re-  
solución de aminoácidos; en la modificación de penicilina  
para formar diversos substratos de la misma; el uso de di-  
versas proteasas en la fabricación de queso, ablandamiento  
15 de la carne, formulaciones de detergentes, manufactura de  
cuero y como agentes auxiliares de la digestión; el uso de  
carbohidrasas en la hidrólisis del almidón, inversión de  
sacarosa, isomerización de glucosa, etc; el uso de nucleasas  
para la regulación de sabores; o el uso de oxidasas para  
20 evitar la oxidación y la regulación del color de los produc-  
tos alimenticios. Estos usos, así como muchos otros, han si-  
do bien descritos en la bibliografía.

                  Como se ha expuesto en lo que antecede, puesto que  
las enzimas son comúnmente solubles en agua y son general-  
25 mente inestables y fácilmente desactivadas, son también di-  
fíciles, bien sea de separar de las soluciones en las que  
se utilizan, para su reutilización subsiguiente, o bien re-  
sulta difícil mantener su actividad catalítica durante un  
período de tiempo relativamente prolongado. Las dificultades  
30 anteriormente mencionadas conducirán, desde luego, a un aumen-

1 to del coste del uso de enzimas para fines comerciales, de-  
bido a la necesidad de una substitución frecuente de la en-  
zima, siendo esta substitución usualmente necesaria después  
5 de cada aplicación. Para contrarrestar el alto coste de la  
substitución, se ha sugerido inmovilizar o insolubilizar  
las enzimas antes de su utilización. Inmovilizando las en-  
zimas mediante diversos sistemas expuestos en lo que sigue  
con mayor detalle, es posible estabilizar las enzimas de  
10 una manera relativa y, por lo tanto, permitir la reutiliza-  
ción de la enzima, la cual puede, de otro modo, experimen-  
tar una desactivación o perderse en el medio de reacción.  
Tales enzimas inmovilizadas o insolubilizadas pueden emplear-  
se en diversos sistemas de reactores, tales como en colum-  
nas de relleno, en reactores constituidos por depósitos  
15 agitados, etc., dependiendo de la naturaleza del sustrato  
que se utiliza en ellos. En general, la inmovilización de  
las enzimas suministra una estabilidad ambiental y estructu-  
ral, más favorable o más general, un mínimo de problemas re-  
lativos a los efluentes y una mínima manipulación de materia-  
20 les, así como la posibilidad de acrecentar la actividad de  
la enzima propiamente dicha.

Como se ha expuesto en lo que antecede, se han des-  
crito varios métodos generales, así como muchas modificacio-  
nes de los mismos, mediante los cuales se puede efectuar la  
25 inmovilización de las enzimas. Un método general consiste  
en adsorber la enzima en una superficie sólida como, por  
ejemplo, cuando una enzima, tal como la acilasa de aminoáci-  
do, se adsorbe sobre un derivado celulósico, tal como celu-  
losa DEAE; la papaína o la ribonucleasa se adsorben sobre vi-  
30 drio poroso; la catalasa se adsorbe sobre carbón vegetal;

1 la tripsina se adsorbe sobre vidrio de cuarzo o celulosa,  
la quimotripsina se adsorbe sobre caolinita, etc. Otro méto  
do general es ocluir una enzima en una malla de gel, tal co  
mo la oclusión de glucosidasa, ureasa, papaína, etc., en un  
5 gel de poliacrilamida; la oclusión de acetilcolinesterasa  
en un gel de almidón o en un polímero de silicona; la oclu  
sión de transaminasa glutámico-pirúvica en un gel de polia  
mida o de acetato de celulosa, etc. Un método general adic  
cional es una reticulación mediante reactivos bifuncionales,  
10 y puede efectuarse en combinación bien sea con cualquiera  
de los métodos generales de inmovilización anteriormente  
mencionados. Cuando se utiliza este método, los reactivos  
bifuncionales o polifuncionales que pueden inducir la reti  
culación intermolecular, unirán covalentemente las enzimas  
15 a cada uno de aquellos, así como sobre un soporte sólido.  
Este método puede ilustrarse mediante el uso de aldehido  
glutárico o ácido bisdiazobenzidina-2',2'-disulfónico para  
unir una enzima, tal como papaína, sobre un soporte sólido,  
etc. Un método adicional más para la inmovilización de una  
20 enzima, comprende el método de una unión covalente, en la  
cual enzimas, tales como glucoamilasa, tripsina, papaína,  
prensasa, amilasa, glucosidasa, pepsina, renina, proteasa fún  
gica, lactasa, etc., se inmovilizan mediante fijación cova  
lente a un material polimérico, que está fijado por diversos  
25 medios a un soporte poroso y sólido, orgánico o inorgánico.  
Este método puede combinarse también con los procedimientos  
de inmovilización anteriormente mencionados.

Los métodos de inmovilizar enzimas arriba enumera  
dos, poseen todos ellos algunas desventajas, que desvirtúan  
30 su utilización en procedimientos industriales. Por ejemplo,

1 cuando una enzima se adsorbe directamente sobre la superfi-  
cie de un soporte, las fuerzas de unión que resultan entre  
la enzima y el soporte portador, son frecuentemente muy dé-  
biles, aunque en algunos casos de la técnica anterior se ha  
5 indicado que se han obtenido conjugados de este tipo, rela-  
tivamente estables, cuando el tamaño de poro del soporte y  
el diámetro del espín de la enzima están correlacionados.  
Sin embargo, en tales casos, se especifica que el tamaño de  
poro del soporte no puede exceder de un diámetro de unos  
10 1.000 Angstroms. En vista de esta débil unión, la enzima se  
desorbe con frecuencia fácilmente, en presencia de solucio-  
nes del substrato que está siendo tratado. Además de esto,  
la enzima puede ser desactivada parcial o extensamente, de-  
bido a su falta de movilidad, o debido a la interacción en-  
15 tre el soporte y el punto activo de la enzima. Otro procedi-  
miento que puede emplearse, es la oclusión de enzimas en  
látices de gel, que puede efectuarse polimerizando una solu-  
ción o emulsión acuosa que contiene la forma monómera del  
polímero y la enzima, o incorporando la enzima al polímero  
20 previamente formado, mediante diversas técnicas, frecuente-  
mente en presencia de un agente de reticulación. Aunque es-  
te método de inmovilizar enzimas ofrece una ventaja debida  
al hecho de que las condiciones de reacción utilizadas para  
llevar a efecto la oclusión son usualmente suaves, de tal  
25 manera que con frecuencia hay poca alteración o desactivación  
de la enzima, tiene también desventajas debidas a que el con-  
jugado tiene una resistencia mecánica escasa, lo que da co-  
mo resultado una compactación cuando se utiliza en columnas  
en los sistemas de flujo continuo, con una obstrucción con-  
comitante de la columna. Tales sistemas tienen también varia

30

21119

1 -ciones bastante amplias del tamaño de poro, conduciendo de  
este modo a algunos tamaños de poro que son suficientemente  
grandes para permitir la pérdida de la enzima. Además, algu  
5 nos tamaños de poro pueden ser suficientemente pequeños, de  
tal modo que las grandes barreras de difusión para el trans  
porte de sustrato y del producto, conducirán a un retardo  
de la reacción, siendo esto especialmente cierto en el caso  
en que se utilice un sustrato de peso molecular alto. Las  
desventajas que hay presentes cuando se inmoviliza una enzi  
10 ma por reticulación intermolecular, como ya se ha señalado,  
son debidas a la falta de movilidad con la desactivación  
consiguiente, debida a la imposibilidad de que la enzima  
asuma la configuración natural necesaria para una actividad  
máxima, en particular, cuando el punto activo interviene en  
15 la operación de unión.

Los métodos de unión covalente han encontrado am-  
plias aplicaciones y pueden ser utilizados, bien sea como  
única técnica de inmovilización, o como una parte integrante  
de muchos de los métodos ya descritos, en los que se emplean  
20 reacciones de reticulación. Este método se utiliza frecuen-  
temente para unir la enzima, así como el soporte, mediante  
una molécula intermediaria bifuncional, en que los grupos  
funcionales de la molécula, tales como, por ejemplo, gamma-  
amino-propiltriétoxosilano, son capaces de reaccionar con  
25 los restos funcionales presentes tanto en la enzima como en  
el soporte poroso, orgánico o inorgánico. De esta manera se  
ha empleado una amplia diversidad de reactivos y soportes,  
y el método tiene la ventaja de suministrar uniones convalen-  
tes fuertes en todo el producto conjugado, así como, en mu-  
30 chos casos, una gran actividad. El enlace covalente de la

1 enzima con el portador, debe llevarse a cabo a través de gru  
pos funcionales de la enzima, que no sean esenciales para  
su actividad catalítica, tales como grupos amino, grupos  
5 carboxilo, grupos hidroxilo, grupos fenólicos, grupos sul-  
fhidrilos, etc., libres. Estos grupos funcionales reacciona  
rán también con una amplia diversidad de otros grupos fun-  
cionales, tales como aldehído, isocianato, acilo, diazo,  
azido, éster activado anhidro, etc., para producir uniones  
10 covalentes. Sin embargo, este método tiene también frecuen-  
temente numerosas desventajas, que implican costosos reaccio  
nantes y disolventes, así como soportes porosos especializa  
dos y costosos, y métodos en varias etapas, engorrosos, que  
hacen que el método de preparación no sea económico para una  
aplicación comercial.

15 Por lo tanto, la técnica anterior está repleta de  
diversos métodos para inmovilizar enzimas, los cuales, sin  
embargo, fallan de diversas maneras para satisfacer los re-  
querimientos del uso industrial económico. Sin embargo, co-  
mo se expondrá con mayor detalle en lo que sigue, ninguna  
20 de las composiciones de la técnica anterior comprende la  
composición de materia de la presente invención, que consti-  
tuye un soporte poroso inorgánico, que contiene un copolíme-  
ro formado in situ a partir de un monómero polifuncional, un  
polímero de bajo peso molecular, un hidrolizado de polímero,  
25 o un polímero previamente formado, de origen natural o sin-  
tético, por reacción con un monómero bifuncional, estando el  
copolímero formado substancialmente ocluido dentro de los  
poros de dicho soporte, y que contiene grupos colgantes, con  
funciones terminales, que sobresalen del mismo; estando la  
30 enzima unida covalentemente a los restos activos en las por

1 -ciones reactivas terminales de los grupos colgantes, permiti-  
tiendo de este modo la libertad de movimientos que permiti-  
rá a la enzima ejercer una actividad máxima. Una porción va-  
riable de la enzima será también adsorbida sobre la matriz,  
5 pero esto se reconocerá como una consecuencia inevitable de  
casi todos los métodos de inmovilización que implican sopor-  
tes inorgánicos porosos, y no debe considerarse como un as-  
pecto crucial de esta invención. Además, la unión entre el  
soporte inorgánico y el copolímero orgánico que ha sido pre-  
10 parado in situ en los poros del soporte, no es covalente,  
sino más bien de naturaleza físico-química y mecánica, y la  
matriz inorgánica-orgánica así producida presenta una alta  
estabilidad y una alta resistencia a la rotura. Como ejem-  
15 plos adicionales de la técnica anterior, la patente de Esta-  
dos Unidos número 3.556.945 se refiere a materiales compues-  
tos enzimáticos, en los que la enzima está adsorbida directa-  
mente a un soporte inorgánico, tal como vidrio. La patente  
de Estados Unidos número 3.519.538 se refiere a materiales  
20 compuestos enzimáticos, en los que las enzimas están copula-  
das químicamente por medio de un agente de copulación de si-  
lano intermediario, a un portador inorgánico. De una manera  
similar, la patente de Estados Unidos número 3.783.101 uti-  
liza también un material compuesto organosilánico como agen-  
te de unión, estando la enzima copulada covalentemente a un  
25 portador de vidrio, por medio de un agente de copulación de  
silano intermedio, estando la porción de silicio del agente  
de copulación fijada al portador, mientras que la porción  
orgánica del agente de copulación está copulada a la enzima,  
conteniendo la composición un óxido metálico sobre la super-  
30 ficie del portador dispuesto entre el portador y la porción

1 de silicio del agente de copulación. En la patente de Estados  
Unidos número 3.821.083, un polímero insoluble en agua, tal  
como poliácroleína, se deposita sobre un portador inorgánico  
y, seguidamente, una enzima se enlaza covalentemente a los  
5 grupos aldehído del polímero. Sin embargo, de acuerdo con  
la mayoría de los ejemplos expuestos en esta patente, es ne-  
cesario hidrolizar primeramente el material compuesto, antes  
de depositar la enzima sobre el polímero. Adicionalmente, el  
producto que se obtiene por el método de esta patente, ad-  
10 lece de varias desventajas, porque, en primer lugar, requie-  
re primero la operación de depósito o inicialmente la forma-  
ción, del polímero deseado en un medio orgánico, seguida por  
su depósito sobre el portador inorgánico, con una subsiguien-  
te operación de purificación, que implica la destilación pa-  
15 ra separar el medio orgánico. Además de esto, en otro método  
expuesto en esta referencia, se requiere una reacción hidro-  
lítica adicional, con el fin de liberar los grupos aldehído  
de la configuración acetálica inicial en la que éstos se  
hallan en el polímero. Puesto que éstos restos aldehído es-  
20 tán fijados directamente a la cadena fundamental del políme-  
ro, la enzima se encuentra también en posición adyacente a  
la superficie del polímero, debido a que dicha enzima está  
separada de la superficie del polímero por solamente un áto-  
mo de carbono del grupo aldehído reaccionante y, por lo tan-  
25 to, la enzima está evidentemente sometida a las influencias  
físico-químicas del polímero, y está también relativamente  
inmovilizada e inhibida para asumir su configuración óptima.  
Otra patente de la técnica anterior, a saber la patente de  
Estados Unidos número 3.705.084, describe un reactor enzimá-  
30 tico macroporoso, en el cual una enzima está adsorbida sobre

1 la superficie polímera de un núcleo de reactor macroporoso  
y, después, es reticulada in situ. Reticulando las enzimas  
sobre la superficie polímera después de la adsorción de éstas,  
5 la enzima se inmoviliza adicionalmente en parte, y no  
puede actuar libremente, como en su estado nativo, como catalizador. La reticulación de enzimas, en efecto, las enlaza entre sí, evitando de este modo un desplazamiento libre de la enzima, y disminuye la movilidad de la enzima, lo cual es un requisito previo necesario para una actividad máxima.

10 La patente de Estados Unidos número 3.654.083 describe un conjugado enzimático, soluble en agua, que se prepara a partir de un soporte orgánico soluble en agua, al cual se reticula la enzima y cuya utilidad está limitada solamente a composiciones limpiadoras y a ungüentos farmacéuticos. Sin embargo, esta composición enzimática adolece también de las desventajas de la estrecha proximidad y entrelazamiento entre enzima y soporte, así como de la escasa resistencia mecánica que muestran generalmente los conjugados enzimáticos basados sobre soportes polímeros orgánicos.

20 La patente de Estados Unidos número 3.796.634 describe también una enzima biológicamente activa e inmovilizada, que difiere en considerable grado de los conjugados enzimáticos inmovilizados de la presente invención. El conjugado enzimático de esta patente consiste en un soporte inorgánico, que comprende partículas coloidales que poseen un tamaño de partícula comprendido entre 50 y 20.000 Angstroms, con una polietilenoimina, siendo esta última reticulada con aldehído glutárico para fijar el polímero reticulado así formado, en forma de una monocapa, sobre la superficie de las  
25 partículas coloidales, seguida por la adsorción de la enzima.  
30

1 directamente sobre esta monocapa. Después de esto, la enzima  
que está adsorbida como una monocapa sobre la superficie de  
las partículas coloidales, se reticula seguidamente con al-  
dehído glutárico adicional a otras moléculas enzimáticas ad-  
5 sorbidas, para evitar que aquella se desorba fácilmente du-  
rante el uso. No existe ninguna indicación de ninguna unión  
covalente entre enzima y matriz polímera, como la que hay  
presente en la presente invención. Por lo tanto, al ser re-  
10 ticuladas las moléculas enzimáticas una con otra, sobre la  
superficie del soporte, este conjugado está sujeto a desac-  
tivación por la reacción de reticulación y por los efectos  
electrónico y estérico de la superficie, poseyendo dicha  
enzima una movilidad limitada. Debido a que el producto de  
15 esta patente es de naturaleza coloidal, posee también una  
utilidad muy limitada para aumentar su escala de producción  
hasta una operación comercial, ya que no puede ser utiliza-  
do en un sistema de flujo continuo, tal como una columna de  
relleno, debido a que o bien sería arrastrado a lo largo y  
20 fuera del sistema con la corriente de líquido en circulación,  
o bien, si se empleara una membrana restringente, las partí-  
culas serían pronto empaquetadas contra la barrera, para  
formar una capa impermeable. Además, tal producto coloidal  
no podría ser utilizado con facilidad en un aparato de lecho  
fluidificado, limitándose de este modo la principal utilidad  
25 a un reactor de tipo discontinuo, tal como un reactor del  
tipo de depósito agitado, desde el cual habría de separarse  
dicho producto, por centrifugación, después de cada ciclo  
de uso. En contraste con esto, los conjugados enzimáticos  
inmovilizados de la presente invención, pueden emplearse en  
30 una amplia diversidad de reactores de tipo discontinuo o con

1 tinuo y, por lo tanto, son mucho más susceptibles de múltiples aplicaciones, en lo que respecta a sus modos de aplicación.

5 Además, otra referencia de la técnica anterior, la patente de Estados Unidos número 3.959.080, se refiere a una matriz portadora para la inmovilización de sustancias bioquímicamente eficaces. Sin embargo, la matriz que se produce de acuerdo con esta referencia, constituye el producto derivado de la reacción de un polímero orgánico, que contiene  
10 grupos de hidrazida ácida o de azida ácida, reticulables, con un agente de reticulación bifuncional, tal como aldehído glutárico. No obstante, esta matriz adolece también de la estabilidad mecánica relativamente escasa y de otras deficiencias, que son características de los soportes enzimáticos orgánicos, así como de las reacciones orgánicas relativamente complicadas, empleadas para la preparación de tales hidrazidas polímeras, etc.

15 Como se mostrará en lo que sigue con mayor detalle, la matriz orgánico-inorgánica de la presente invención suministrará un soporte, al cual puede unirse covalentemente una  
20 enzima, para suministrar un material compuesto catalítico, que mantenga su actividad y su estabilidad durante un periodo de uso relativamente prolongado.

#### MEMORIA DESCRIPTIVA

25 Esta invención se refiere a composiciones de materia que comprenden matrices de soporte para enzimas inmovilizados. Más específicamente, la invención concierne a matrices de soporte, que consisten en un material compuesto orgánico-inorgánico, en el cual el material de soporte inorgánico está combinado con un copolímero orgánico preparado in situ y  
30

1 substancialmente ocluido dentro de los poros del soporte  
inorgánico. El copolímero se forma por reacción de aminopo-  
licstireno con un exceso suficiente de un monómero bifuncio-  
nal, que contiene restos reactivos adecuados, para obtener  
5 un producto copolímero que contiene grupos colgantes con  
funciones terminales, capaces de unir enzimas covalentemen-  
te a sus porciones reactivas terminales. Además, la invención  
conciérne también a un procedimiento para la preparación de  
estas matrices.

10 Como se ha expuesto en lo que antecede, el uso de  
enzimas en aplicaciones analíticas, médicas o industriales  
puede acrecentarse en gran manera, en el caso de que dichas  
enzimas estén en un estado inmovilizado, es decir, en que  
dichas enzimas, al estar en combinación con otros materia-  
15 les sólidos, estén por sí mismas en un estado tal en el que  
no sean solubles en agua y, por lo tanto, puedan ser somet-  
das a un uso repetido, mientras se mantiene la actividad ca-  
talítica de dicha enzima. Con el fin de que estén presentes  
en un estado inmovilizado, las enzimas deben unirse de algu-  
20 na manera a un portador insoluble en agua, para que, de es-  
te modo, sean utilizables comercialmente en un estado inso-  
luble en agua.

Por lo tanto, un objeto de esta invención es sumi-  
nistrar nuevas composiciones de materia, en las que las en-  
25 zimas puedan estar covalentemente unidas, en un estado inmo-  
vilizado.

Un objeto adicional de esta invención es suminis-  
trar un procedimiento para la preparación de matrices de so-  
porte combinadas, inorgánicas-orgánicas, que se utilizan pa-  
30 ra unir covalentemente una enzima a los grupos colgantes

1 con grupos funcionales, en sus porciones terminales reactivas.

5 En un aspecto, una realización de esta invención reside en una matriz orgánico-inorgánica, que comprende un soporte sólido poroso, inorgánico e insoluble en agua, en combinación con un material copolímero que resulta de la reacción de aminopoliestireno y un monómero bifuncional.

10 Una realización adicional de esta invención se encuentra en un método para preparar una matriz orgánico-inorgánica, depositando una sal de aminopoliestireno sobre un soporte sólido, desde una solución acuosa a un pH inferior a 7 y, después, hacer reaccionar el material compuesto resultante de aminopoliestireno-soporte sólido, con un monómero bifuncional, para formar la deseada matriz orgánico-inorgánica.

15 Una realización específica de esta invención se encuentra en una matriz orgánico-inorgánica, que comprende alumina gamma que tiene combinado con ella un copolímero que resulta de la reacción de aminopoliestireno con un exceso de aldehído glutárico.

20 Otra realización específica de esta invención se encuentra en un procedimiento para preparar una matriz orgánico-inorgánica, que comprende depositar la sal del ácido clorhídrico del aminopoliestireno sobre alúmina gamma, desde una solución acuosa a un pH en el margen comprendido entre aproximadamente 1 y aproximadamente 4, hacer reaccionar después el material compuesto resultante de aminopoliestireno-alúmina gamma, con un exceso de aldehído glutárico, y recuperar la matriz orgánico-inorgánica resultante.

30 Otra realización específica de esta invención resi

1 de en un procedimiento para la preparación de una matriz  
orgánico-inorgánica, que comprende tratar un soporte sólido  
poroso, inorgánico e insoluble en agua, con un monómero de  
estireno, polimerizar el material compuesto de estireno-so-  
5 porte sólido, en condiciones de polimerización, nitrar el ma-  
terial compuesto resultante de poliestireno-soporte sólido,  
reducir el material compuesto nitrato de poliestireno-sopor-  
te sólido y, después, hacer reaccionar el material compues-  
to resultante de aminopoliestireno-soporte sólido con un mo-  
10 nómero bifuncional, para formar la deseada matriz orgánico-  
-inorgánica.

Otros objetos y realizaciones se encontrarán en la  
descripción siguiente y más detallada de la presente inven-  
ción.

15 Como se ha expuesto en lo que antecede, la presente  
invención concierne a matrices de soporte, que se utilizan  
para inmovilizar enzimas, comprendiendo dichas matrices un  
material compuesto orgánico-inorgánico, que consiste en un  
material de soporte inorgánico del tipo expuesto en lo que  
20 sigue con mayor detalle, combinado con un material orgánico  
copolímero, el cual, en el caso de un soporte poroso, está  
substancialmente ocluido en los poros de dicho soporte poro-  
so. El material compuesto copolímero contendrá grupos col-  
gantes que sobresalen de él, conteniendo dichos grupos col-  
25 gantes restos funcionales situados terminalmente, que permi-  
tirán que una enzima se una covalentemente a dicho grupo,  
en sus porciones terminales reactivas. Además, la invención  
concierne también a un procedimiento para preparar estas ma-  
trices de soporte, utilizando reaccionantes relativamente  
30 baratos, así como utilizando etapas más sencillas en el pro-

1 cedimiento para la preparación de dichas composiciones. Ade-  
más, la resistencia mecánica y la estabilidad de los conju-  
gados enzimáticos que resultan de la unión covalente de en-  
zimas a estas matrices de soporte, serán mayores que las  
5 que poseen las enzimas inmovilizadas de la técnica anterior.  
Por lo tanto, resultará fácilmente evidente que las composi-  
ciones de materia de la presente invención poseen ventajas  
económicas, que son utilizables para aplicaciones industria-  
les.

10 Ejemplos de soportes inorgánicos que pueden ser  
utilizados como un componente de las matrices de soporte de  
la presente invención, consistirán en una amplia diversidad  
de materiales, que incluyen soportes porosos, tales como  
alúmina, que posee diámetros de poro que van desde 100  $\mu$ mgs  
15 troms hasta 55.000 Angstroms, y que posee también una densi-  
dad aparente (ABD) comprendida en el margen de 0,1 a 0,6.  
El area superficial del soporte poroso inorgánico particu-  
lar, variará también a lo largo de un margen relativamente  
amplio, siendo dicho margen entre 1 y 500  $m^2/g$ , siendo el  
20 margen de área superficial preferido entre 5 y 400  $m^2/g$ . La  
configuración del material de soporte poroso inorgánico va-  
riará, dependiendo del tipo particular de soporte que se  
utilice. Por ejemplo, el material de soporte puede estar en  
forma esférica, en forma de partículas, que van desde partí-  
25 culas finas hasta macroesferas, en forma de monolito cerámi-  
co, que puede estar o no recubierto con un óxido inorgánico  
poroso, una membrana, fibras cerámicas, solas o tejidas en  
una tela, sílice, mezclas de óxidos metálicos, partículas  
de arena, zeolitas o mica. El tamaño de partícula puede tam-  
30 bién variar a lo largo de un amplio margen, dependiendo nue-

1 vamente del tipo particular de soporte que se emplea y, tam  
bién del sustrato y del tipo de instalación en el que el  
conjugado enzimático ha de utilizarse. Por ejemplo, si el  
soporte es de forma esférica, las esferas pueden oscilar en  
5 tamaño desde 0,25 hasta 6,35 mm de diámetro, oscilando el  
tamaño preferido entre 0,79 y 3,17 mm de diámetro. Cuando  
el soporte está en forma de partículas, el tamaño de partí-  
cula puede oscilar también entre los mismos límites. En tér  
minos de tamaños de malla US standard, tales partículas  
10 pueden oscilar entre malla 2,5 y malla 100, prefiriéndose  
los tamaños de malla 10-40. De igual modo, si el soporte es  
está en forma de fibras cerámicas, las fibras pueden oscilar  
entre 0,5 y 20 micras de diámetro o, si está en forma de mem  
brana, la membrana puede comprender un material cerámico  
que está colado en forma de una lámina delgada. Debe enten-  
15 derse que los tipos anteriormente mencionados de configura-  
ción de soporte y de tamaño de los diversos soportes, se dan  
simplemente con fines de ilustración, y que no se pretende  
que la presente invención esté necesariamente limitada a  
20 ellos.

También se considera que los materiales de soporte  
porosos pueden estar recubiertos con diversos óxidos del ti  
po expuesto en lo que antecede, o consistir en mezclas de  
los mismos, o pueden tener incorporadas a ellos otros diver-  
25 sos materiales inorgánicos, tales como fosfato de boro, co-  
municando estos materiales inorgánicos una propiedades es-  
peciales al material de soporte. Una forma de soporte parti-  
cularmente útil estará constituido por un cuerpo cerámico,  
que puede tener el tipo de porosidad aquí descrito para los  
30 materiales de la presente invención, o puede ser de estruc-

1 tura en panel, con canales de conexión de tamaño macroscópi  
co por toda su masa, conociéndose tales materiales comúnmen  
te como monolitos, y los cuales pueden estar recubiertos con  
diversos tipos de alúmina, óxido de zirconio u óxido de ti-  
5 tano, porosos. El uso de un tipo de soporte como éste tie-  
ne la ventaja particular de permitir la libre circulación de  
substratos altamente viscosos que se encuentran con frecuen  
cia en las reacciones comerciales catalizadas por enzimas.  
Un componente de la porción orgánica de la matriz de soporte  
10 comprende un aminopoliestireno, mientras que el otro compo  
nente de la porción orgánica comprende un monómero bifuncio  
nal. El reaccionante monómero bifuncional está presente en  
un exceso suficiente como el que se necesita para producir  
grupos colgantes con funciones terminales, estando presente  
15 dicho monómero bifuncional en un margen comprendido entre 2  
y 50 moles con relación a los restos reactivos del material  
compuesto de soporte, siendo el margen preferido de 4 a 25  
moles de exceso.

Los grupos funcionales que están presentes en el mo  
20 número bifuncional, comprenderán restos reactivos bien cono  
cidos, capaces de unirse fácilmente con grupos amino, tales  
como restos carbonilo, acilo o isocianato. Los grupos reac  
tivos de los compuestos bifuncionales están preferiblemente,  
pero no necesariamente, separados por cadenas que contienen  
25 de 4 a 10 átomos de carbono. Los restos reactivos de los com  
puestos bifuncionales son capaces, por lo tanto, de unirse  
covalentemente tanto con el componente de aminopoliestireno  
de la matriz de soporte, como subsiguientemente, después de  
eliminar por lavado los materiales que no han reaccionado,  
30 también con los grupos amino de la enzima, la cual hay que

1 añadirla en una etapa subsiguiente, uniéndose entonces dicha  
enzima, covalentemente, con el grupo funcional reactivo de  
la porción terminal de la cadena colorante. Después de la  
adición de la enzima a esta composición, se producirá un  
5 conjugado enzimático relativamente estable, que posee una  
alta actividad y una alta estabilidad. La enzima que no ha  
reaccionado puede ser también recuperada para su reutiliza-  
ción. Debido al gran exceso de compuesto intermedio, o de  
moléculas monómeras bifuncionales espaciadoras que se utili-  
10 zan, la matriz contendrá grupos colgantes que comprender las  
moléculas espaciadoras, sobresaliendo dichas moléculas de  
la matriz y teniendo restos reactivos disponibles en sus  
porciones terminales, que son capaces de reaccionar con la  
enzima y de unirla a las moléculas espaciadoras anteriormen-  
15 te mencionadas, mediante enlaces covalentes. Por lo tanto,  
resulta fácilmente evidente que se formará una matriz orgá-  
nico-inorgánica adecuada, que será aplicable a la unión de  
enzimas, siempre que se utilice un exceso de la molécula bi-  
funcional suficientemente grande para que suministre grupos  
20 pendientes reactivos que sean capaces de reaccionar subsi-  
guientemente con la enzima que ha de ser inmovilizada. Uti-  
lizando estos grupos colgantes funcionales como punto de  
unión para las enzimas, será posible que las enzimas tengan  
una mayor movilidad y por lo tanto, será posible que la acti-  
25 vidad catalítica de la enzima permanezca a un alto nivel,  
durante un periodo de tiempo relativamente más largo, de lo  
que se conseguiría con una enzima que haya sido inmovilizada  
por cualesquiera de los otros métodos, tales como oclusión  
en una malla de gel, adsorción sobre una superficie sólida  
30 o reticulación de la enzima con moléculas enzimáticas adya-

1 centes mediante reactivos bifuncionales, etc. Sin embargo,  
no todas las formulaciones producirán resultados equivalentes, en términos de estabilidad o actividad.

5 Ejemplos de enzimas que pueden ser inmovilizadas por una reacción de unión covalente, y que contienen un grupo amino capaz de reaccionar con un resto aldehídico, isocianato, acilo o éster, del grupo colgante que está fijado a un material polímero substancialmente ocluido en los poros de un material de soporte poroso, incluirán: tripsina, papaína, hexoquinasa, beta-galactosidasa (lactasa), ficina, bromelaína, lactato deshidrogenasa, glucoamilasa, quimotripsina, pronasa, glucosa, isomerasa, acilasa, invertasa, amilasa, glucosidasa, pepsina, renina, proteasa, xilanasa y celulasa. En general, puede utilizarse cualquier enzima cuyo punto activo no esté implicado en la unión covalente, aunque no necesariamente con resultados equivalentes. Aunque la exposición anteriormente mencionada estaba centrada sobre grupos colgantes que contienen como resto funcional sobre ellos un grupo aldehídico o isocianato, se considera también dentro del alcance de esta invención que el grupo colgante puede contener otros restos funcionales capaces de reaccionar con entidades carboxilo, sulfhidrilo u otras entidades, usualmente presentes en las enzimas. Sin embargo, la unión covalente de enzimas que contienen estos otros restos con otros grupos colgantes, puede efectuarse no necesariamente con resultados equivalentes, y puede implicar también costes apreciablemente mayores para la preparación de los compuestos intermedios. Ha de entenderse que la enumeración anteriormente mencionada de soportes sólidos porosos, monómeros, hidrolizados, polímeros y enzimas, es solamente representativa

10  
15  
20  
25  
30

1 de las diversas clases de compuestos que pueden utilizarse,  
y que la presente invención no está necesariamente limitada  
a ellos.

5 La preparación de las composiciones de materia de  
la presente invención, se lleva a efecto, preferiblemente,  
en una operación de tipo discontinuo. En un método de prepa  
ración preferidos, el material de soporte inorgánico se tra  
tará con una solución, preferiblemente de naturaleza acuosa,  
de una sal de aminopoliestireno, manteniéndose la solución  
10 acuosa a un pH inferior a 7 y, preferiblemente, en un margen  
de 1 a 4. Ejemplos de sales de aminopoliestireno que pueden  
emplearse, incluirán sal del ácido clorhídrico, sal del áci  
do sulfúrico, sal del ácido nítrico y sal del ácido fosfóri  
co, de aminopoliestireno. El pH de la solución acuosa se  
15 mantiene al nivel deseado mediante la adición de un ácido,  
tal como los expuestos a continuación. Después de completa  
da la adición de sal de ácido del aminopoliestireno, lo que,  
en una realización preferida de la invención, se efectúa a  
la temperatura ambiente y a la presión atmosférica, se colo  
20 ca la mezcla preferiblemente bajo vacío, durante un período  
de tiempo que puede oscilar desde una duración de 0,5 hasta  
4 horas o más. Después de completado el tiempo de reacción,  
se separa la solución que no ha sido adsorbida, y se deja  
secar al aire el soporte tratado. Después el material com  
25 puesto orgánico-inorgánico se pone en contacto con un exce  
so suficientemente grande de un monómero bifuncional, desde  
2 a 50 moles en proporción relativa al contenido de amina  
del aminopoliestireno inicial, para suministrar grupos col  
gantes que sobresalen del copolímero resultante, conteniend  
30 do dichos grupos colgantes restos funcionales terminales

1 que no han reaccionado. El monómero bifuncional se añade  
también preferiblemente en una solución acuosa, la cual se  
retira después de la reacción con el aminopoliestireno, y  
la matriz resultante se lava para separar cualquier monómero  
5 bifuncional que pueda estar todavía presente. El método  
puede conducirse en un margen de temperaturas comprendido  
entre 4 y 60°C, preferiblemente, entre 20 y 25°C.

En otro método de preparación preferido, se prepara  
10 un sistema en emulsión, que consiste en estireno, junto  
con aditivos tales como hidrogenofosfato de sodio o lauril-  
sulfato sódico en solución acuosa. El soporte sólido que  
puede estar en una forma expuesta en lo que sigue con mayor  
detalle, tal como de nódulos, glóbulos o monolitos, se colo-  
ca en la solución y se deja que proceda la adsorción de la  
15 solución de la emulsión, durante un periodo de tiempo que  
puede oscilar desde 0,5 hasta 2 horas de duración, efectúan-  
dose preferiblemente dicha adsorción a presiones inferiores  
a la atmosférica, usualmente bajo vacío. Después de comple-  
tado el periodo de adsorción, la mezcla se calienta a conti-  
20 nuación hasta una temperatura que puede oscilar desde 50 a  
100°C, durante un periodo de tiempo, utilizando un cataliza-  
dor de polimerización, tal como persulfato potásico. Después  
de dejar que proceda la polimerización del estireno durante  
un periodo de tiempo que puede oscilar desde 2 a 4 horas de  
25 duración, se interrumpe el calentamiento, y el soporte com-  
puesto, sólido, que contiene el estireno polimerizado, se  
recupera desde la solución acuosa, se lava con agua destila-  
da y con un disolvente, tal como acetona o benceno, para se-  
parar cualquier estireno sin reaccionar. Alternativamente,  
30 el estireno puede ser polimerizado sin recurrir a un tipo de

1 polimerización en emulsión. Cuando se lleva a efecto este  
método de preparación, el soporte se añade a solamente el  
monómero de estireno líquido, y se deja que el estireno se  
adsorba, preferiblemente bajo vacío, durante un periodo de  
5 tiempo predeterminado. Al final de este periodo de adsorción,  
se añaden agua y un catalizador, tal como persulfato potási  
co, después se calienta la mezcla hasta el margen de tempera  
tura anteriormente mencionado, y se deja que proceda la po-  
limerización durante un periodo de tiempo predeterminado.  
10 Al final del periodo de polimerización, se recupera el mate  
rial compuesto de poliestireno-soporte sólido, de una manera  
similar a la expuesta en lo que antecede.

Seguidamente, se lleva a efecto la nitración del ma  
4 terial compuesto de poliestireno-soporte sólido, añadiendo  
15 el material compuesto a un agente de nitración, tal como áci  
do nítrico y, preferiblemente, ácido nítrico fumante del 90%.  
La adición se lleva a efecto a una velocidad relativamente  
lenta, mientras se mantiene el ácido nítrico preferiblemente  
a temperaturas inferiores a la ambiente, que oscila entre 0  
20 y 10°C, mediante medios de refrigeración exteriores, tales  
como un baño de hielo o serpentines de refrigeración. Sin  
embargo, tales temperaturas bajas no son esenciales para el  
éxito de la reacción de nitración y, si se desea, pueden em  
plearse temperaturas más altas. Se deja que la nitración del  
25 material compuesto de poliestireno-soporte sólido proceda du  
rante un periodo de tiempo que puede oscilar entre 1 y 4 ho  
ras o más, después de lo cual se recupera el material com-  
puesto de poliestireno-soporte sólido, nitrado, y se lava de  
nuevo con agua y con un disolvente.

30 Después, el material compuesto de nitropoliestire-

1 no-soporte sólido se añade seguidamente a una solución acuosa que contiene un agente reductor, tal como ditionito sódico, tras lo cual se calienta la solución hasta una temperatura en el margen de 50 a 100°C, y se mantiene a esta temperatura durante un periodo de tiempo que puede oscilar desde 5 0,5 a 2 horas. Al final de este periodo de tiempo, se recupera la matriz de aminopoliestireno-soporte, se lava, se seca bajo vacío y, preferiblemente, se mantiene bajo una capa protectora de nitrógeno. Para preparar la matriz de soporte 10 desecada, que contendrá grupos colgantes, a los que puede inmovilizarse una enzima, la matriz de aminopoliestireno-soporte sólido se pone en contacto seguidamente con un exceso suficientemente grande de monómero bifuncional, de 2 a 50 15 proporciones molares con relación a los grupos amino del aminopoliestireno, que reaccionará con ella para suministrar grupos colgantes que sobresalen del copolímero resultante que contiene entidades funcionales terminales sin reaccionar. Este monómero bifuncional se añade preferiblemente en una solución acuosa, con lo que el copolímero que se forma 20 será substancialmente ocluido en los poros del soporte inorgánico. Seguidamente, la matriz de soporte se lava con agua destilada, para separar cualquier monómero bifuncional que no haya reaccionado.

25 Como se ha expuesto en lo que antecede, el uso de un exceso del monómero bifuncional en los métodos preferidos de preparación, dará como resultado grupos colgantes que sobresalen de la matriz, que contienen restos funcionales terminales sin reaccionar. Entonces, las entidades funcionales sin reaccionar están disponibles para unión covalente a la 30 enzima, la cual se añade a la matriz, usualmente de nuevo en

1 solución acuosa. Después de separar los materiales sin  
reaccionar, por métodos convencionales, tales como lavado,  
la enzima que está unida covalentemente a los grupos colgan-  
tes con funciones, permanece unida a las porciones termina-  
5 los de los mismos. Por lo tanto, resulta fácilmente eviden-  
te que la totalidad del método de inmovilización puede ser  
llevada a cabo de una manera sencilla y barata, por ejemplo,  
en una columna rellena con los soportes inorgánicos, uti-  
lizando un medio acuoso o medios disolventes baratos. El  
10 método se lleva a efecto mediante la utilización de un míni-  
mo de etapas de operación y, además, permitiendo una fácil  
recuperación de los reaccionantes en exceso, de la enzima  
sin unir y de la composición de materia acabada, estando el  
exceso de reaccionantes y las enzimas sin unir disponibles  
15 para su reutilización.

También se considera dentro del alcance de esta in-  
vención, que la formación de la composición de materia aca-  
bada puede efectuarse también en un modo de operación conti-  
nuo. Un método que puede emplearse se lleva a efecto colo-  
20 cando una cantidad del soporte sólido en un aparato apropia-  
do, que usualmente está constituido por una columna. Como  
en el caso de la operación de tipo discontinuo, el material  
de soporte sólido puede estar en cualquier forma deseada,  
tal como polvo, nódulos o monolitos, y se coloca en la co-  
25 lumna, después de lo cual se carga también una solución,  
preferiblemente acuosa, de una sal de aminopoliestireno, la  
cual se mantiene en contacto con el soporte hasta que este  
último está saturado con la solución. La solución acuosa se  
mantiene a un pH inferior a 7 y, preferiblemente, a un pH  
30 comprendido en un margen de 1 a 4, mediante la adición de

1 un ácido apropiado. Después de que se ha llevado a cabo la  
saturación del soporte, se escurre un exceso seguidamente,  
y se carga a la columna un compuesto espaciador intermedia-  
rio, tal como una molécula monómera bifuncional reactiva,  
5 preferiblemente en solución acuosa, estando presente dicha  
molécula bifuncional en un exceso comprendido en un margen  
de 2 a 50 moles con relación al contenido de amina del ami-  
nopoliestireno. Mientras que la formación de la matriz se  
lleva a efecto durante un periodo de tiempo que puede osci-  
10 lar de 1 a 22 horas de duración, la formación se lleva a ca-  
bo usualmente durante un periodo de tiempo relativamente  
corto. Una vez completado el tiempo de permanencia deseado,  
se separa el exceso de reaccionante espaciador, tal como al  
dehído glutárico, por escurrido, seguido por un lavado a  
15 fondo con agua, para separar cualesquiera materiales sin  
reaccionar.

Para formar un conjugado enzimático inmovilizado,  
se hace pasar después por la columna, que contiene la matriz  
de soporte así formada, una solución acuosa de una enzima  
20 del tipo expuesto en lo que antecede con mayor detalle, efec-  
tuándose de este modo una unión covalente de la enzima con  
los grupos reactivos terminales de los restos colgantes con  
funciones que sobresalen de la matriz. Esto tiene lugar has-  
ta que no hay ninguna unión covalente más de la enzima con  
25 las moléculas colgantes. El exceso de enzima se recupera en  
el efluente que se retira continuamente después del escurri-  
do, y puede reciclarse a la columna para nueva utilización.  
Después de lavar la columna, la columna se halla entonces  
lista para ser utilizada en reacciones químicas, en las que  
30 ha de tener lugar el efecto catalítico de la enzima. Estos

1 métodos se llevan a cabo dentro de los parámetros de tiempo,  
temperatura y concentración expuestos en lo que antecede y  
descritos en el método de tipo discontinuo, y darán como re-  
sultado complejos enzimáticos inmovilizados semejantes. Tam-  
5 bién se considera dentro del alcance de esta invención, que  
con modificaciones adecuadas de los parámetros de reacción,  
será evidente para los expertos en la técnica que el proce-  
dimiento puede aplicarse a una amplia diversidad de soportes,  
monómeros difuncionales y enzimas.

10 Los siguientes ejemplos se dan con fines de ilustra-  
ción de las nuevas composiciones de materia de la presente  
invención y de los métodos para preparar las mismas. Sin em-  
bargo, ha de entenderse que estos ejemplos se dan simplemen-  
te con fines de ilustración, y que la presente invención no  
15 está necesariamente limitada a ellos.

#### EJEMPLO 1

En este ejemplo, se mezcló 1 g de una base de alú-  
mina porosa, que tenía un tamaño de partícula comprendido en-  
tre aberturas de malla de 0,707 mm y 0,420 mm, una densidad  
20 aparente (ABD) de 0,34, y un tamaño de poro que oscilaba en-  
tre 200 Angstroms y 10.000 Angstroms, con 10 ml de un 5% en  
peso por volumen de aminopoliestireno, que tenía un peso mo-  
lecular de 22.000, disuelto en ácido clorhídrico acuoso 0,1  
molar. Los dos componentes se mezclaron a la temperatura am-  
25 biente y se dejaron en reposo durante un periodo de una hora.  
Al final de este tiempo, se desgasificó la solución, se fil-  
tró y se secó el soporte sólido que contenía adsorbido so-  
bre él el aminopoliestireno. Después de ello, el material  
compuesto se mezcló con 10 ml de una solución acuosa al 1,5%  
30 de aldehído glutárico, que tenía un pH de 1,4, y se mantuvo

1 durante un periodo de una hora a la temperatura ambiente.  
Al final de este periodo de una hora, se decantó el exceso  
de aldehido glutárico y la matriz orgánico-inorgánica se la  
5 lavó a fondo con agua, varias veces. Seguidamente, el conjuga  
do inmovilizado final se preparó por tratamiento de la ma-  
triz con 6482 unidades de una glucoamilasa comercial, ven-  
dida bajo el nombre comercial de "Ambazyme". La inmoviliza-  
ción de la enzima se llevó a efecto durante un periodo de  
16 horas, mientras se mantenía la temperatura del material  
10 compuesto a 4°C, por medio de un baño de hielo. Al final  
del periodo de 16 horas, la enzima residual no unida se se-  
paró por lavado con agua y con una solución de cloruro sódico.

15 El conjugado enzimático inmovilizado se cargó en  
una columna y se hizo pasar por los glóbulos un 30% en volu-  
men de solución de almidón vendido bajo el nombre comercial  
de "Maltrin-150", mientras se mantenía la temperatura a 60°C,  
haciéndose pasar por los glóbulos dicha alimentación de al-  
midón durante un periodo de 2 horas, a un caudal de 2 ml/mi-  
20 nuto. Al final del periodo de 2 horas, se determinó la can-  
tidad de glucosa formada. Se encontró que la actividad del  
conjugado enzimático era de 3.240 unidades/g, para el caudal  
de 2 ml/minuto; definiéndose la unidad como los micromoles  
de glucosa formados por minuto y por gramo de conjugado en-  
25 zimático inmovilizado.

#### Ejemplo II

30 Se repitió el experimento anterior, a excepción de  
que la enzima, a saber la glucoamilasa, se purificó por me-  
dio de un método de precipitación con isopropanol bien cono-  
cido en la técnica, dando como resultado un aumento de la

1 pureza de la enzima en 1,3 veces. Una vez que esta enzima  
purificada fue inmovilizada de una manera similar a la ex-  
puesta anteriormente, y utilizada para convertir almidón en  
glucosa, se encontró que el conjugado enzimático inmoviliza-  
5 do tenía una actividad de 4070 unidades/g, para un caudal  
de 2 ml/minuto.

### EJEMPLO III

De una manera similar a la expuesta en el Ejemplo  
I anterior, se añadió 1 g de una base de alúmina, que tenía  
10 un tamaño de partícula comprendido entre aberturas de malla  
0,707 mm y 0,500 mm, y una densidad aparente 0,3, a 10 ml  
de una solución que comprendía un 5% en volumen de aminopo-  
liestireno disuelto en ácido clorhídrico acuoso 0,1 molar.  
La mezcla se mantuvo a la temperatura ambiente durante un  
15 período de una hora, después de lo cual se desgasificó, se  
filtró y se secó la matriz de aminopoliestireno-alúmina.  
Los glóbulos secados se añadieron a continuación a 10 ml de  
una solución acuosa al 1,5% de aldehído glutárico, que tenía  
un pH de 1,4. La mezcla se mantuvo durante un periodo de  
20 una hora a la temperatura ambiente y, después, se decantó  
el exceso de aldehído glutárico. La matriz orgánico-inorgá-  
nica se lavó varias veces con agua y, después, se trató con  
1.300 unidades de glucosa isomerasa, que tenía una actividad  
específica de 8,5 unidades/mg de proteína. La copulación se  
25 efectuó a una temperatura de 40°C, durante un periodo de  
22 horas. El conjugado de glucosa isomerasa inmovilizado re-  
sultante, en el cual la enzima estaba unida covalentemente  
a las funciones aldehído libres del material copolímero, las  
cuales surgieron del uso de un exceso de aldehído glutárico,  
30 se lavó a fondo con agua y con una solución acuosa de cloru

1 ro sódico 2 Moler, para separar cualquier enzima sin reac-  
cionar.

5 El conjugado enzimático inmovilizado se cargó en  
una columna adecuada y a través del lecho de conjugado se  
hizo pasar una solución al 45% de fructosa, que poseía un  
pH de 8 y que contenía cloruro magnésico  $5 \times 10^{-3}$  molar, a  
una temperatura de 60°C, durante un periodo de 2 horas. Se  
determinaron el contenido de glucosa y el caudal, encontrán-  
dose que este conjugado enzimático inmovilizado tenía una  
10 actividad de 700 unidades/g, para un caudal de 2 ml/minuto,  
con una eficacia de copulación del 60%. Se determinó, además,  
que el conjugado enzimático poseía una vida media de 22 días  
a 60°C, en una operación continua en columna, utilizando el  
caudal de 2 ml/minuto para la alimentación a través del con-  
jugado.  
15

#### EJEMPLO IV

En este ejemplo, una base de alúmina, que tenía un  
tamaño de partícula comprendido entre aberturas de malla  
0,250 mm y 0,177 mm y una densidad aparente de 0,3, se tra-  
20 tó con aminopoliestireno y con un exceso de aldehído glutá-  
rico, de una manera similar a la expuesta anteriormente, pa-  
ra formar una matriz de soporte orgánico-inorgánica. Esta  
matriz de soporte se trató con glucosa isomerasa, que poseía  
una actividad específica de 15 unidades/mg. La copulación  
se efectuó ofreciendo 2.800 unidades de enzima a la matriz  
25 de soporte, a una temperatura de 4°C, durante un periodo de  
22 horas. Después de lavar a fondo el conjugado enzimático  
inmovilizado, éste se cargó en una columna y a través del  
lecho de conjugado se hizo pasar una alimentación de fructo-  
30 sa similar a la descrita en el Ejemplo III anterior, durante

1 un periodo de 2 horas, a una temperatura de 60°C. Se sometió  
el producto a ensayo, encontrándose que el conjugado enzimá-  
tico inmovilizado tenía una actividad de 1.200 unidades/g,  
con una eficacia de copulación del 54%.

5 EJEMPLO V.

En este ejemplo, 1 g de nódulos de alúmina porosa,  
de malla 10, que tenía una densidad aparente de 0,344 y  
unos tamaños de poro que oscilaban entre 200 Anstroms y  
10.000 Angstroms, se colocó en una emulsión preparada a par-  
tir de 0,5 g de hidrogenofosfato de sodio, 0,5 g de lauril-  
sulfato sódico, 2 ml de estireno y 20 ml de agua destilada.  
Se dejó que los nódulos adsorbieran esta emulsión, bajo va-  
cío, durante un periodo de una hora, después de lo cual se  
calentó la mezcla durante un periodo de 3 horas, a una tem-  
peratura de 100°C, en presencia de un catalizador de polime-  
rización que comprendía 0,5 g de persulfato potásico. Al fi-  
nal del periodo de 3 horas, los glóbulos se filtraron para  
separar el líquido, se lavaron con agua destilada y con 100  
ml de acetona. Después, se añadió lentamente 1 g del soporte  
de poliestireno-alúmina a 50 ml de ácido nítrico fumante  
del 90%. La adición del soporte al ácido se efectuó a una  
temperatura de unos 0 a 10°C, alcanzándose la temperatura me-  
diante colocación del aparato en un baño de hielo. Al cabo  
de un periodo de 2 horas, se retiró el soporte nitrado, se  
lavó con agua y con acetona. Para llevar a efecto la reduc-  
ción del soporte nitrado de poliestireno-alúmina, se añadió  
1 g del material compuesto, junto con 1 g de ditionito sódico,  
a 100 ml de agua destilada. Seguidamente, se calentó la  
mezcla hasta ebullición y se mantuvo a esta temperatura du-  
rante un periodo de una hora. Después de esto, se lavó el

1 soporte de material compuesto de aminopoliestireno-alúmina  
con agua destilada, se secó bajo vacío y se mantuvo bajo una  
atmósfera de nitrógeno.

5 El soporte de aminopoliestireno-alúmina preparado  
de acuerdo con el párrafo anterior se puso seguidamente en  
contacto con 10 ml de una solución acuosa al 50% de aldehído  
glutárico, que tenía un pH de 3,5, durante un periodo de una  
hora a la temperatura ambiente. Al cabo de un periodo de 1  
hora, se decantó el exceso de aldehído glutárico y la matriz  
10 orgánico-inorgánica se lavó a fondo con agua, varias veces,  
con el fin de separar eficazmente los reaccionantes que no  
habían reaccionado. El conjugado enzimático inmovilizado fi-  
nal se preparó seguidamente, por tratamiento de la matriz  
con 8300 unidades de una glucosaamilasa comercial vendida  
15 bajo el nombre comercial de Novo PPAG-12, efectuándose dicha  
inmovilización de la enzima durante un periodo de 16 horas,  
mientras se mantenía la temperatura de la mezcla a unos 4°C  
por medio de un baño de hielo. Al cabo del periodo de 15 ho-  
ras, la enzima residual y sin unir se separó por lavado con  
20 agua y con una solución de cloruro sódico.

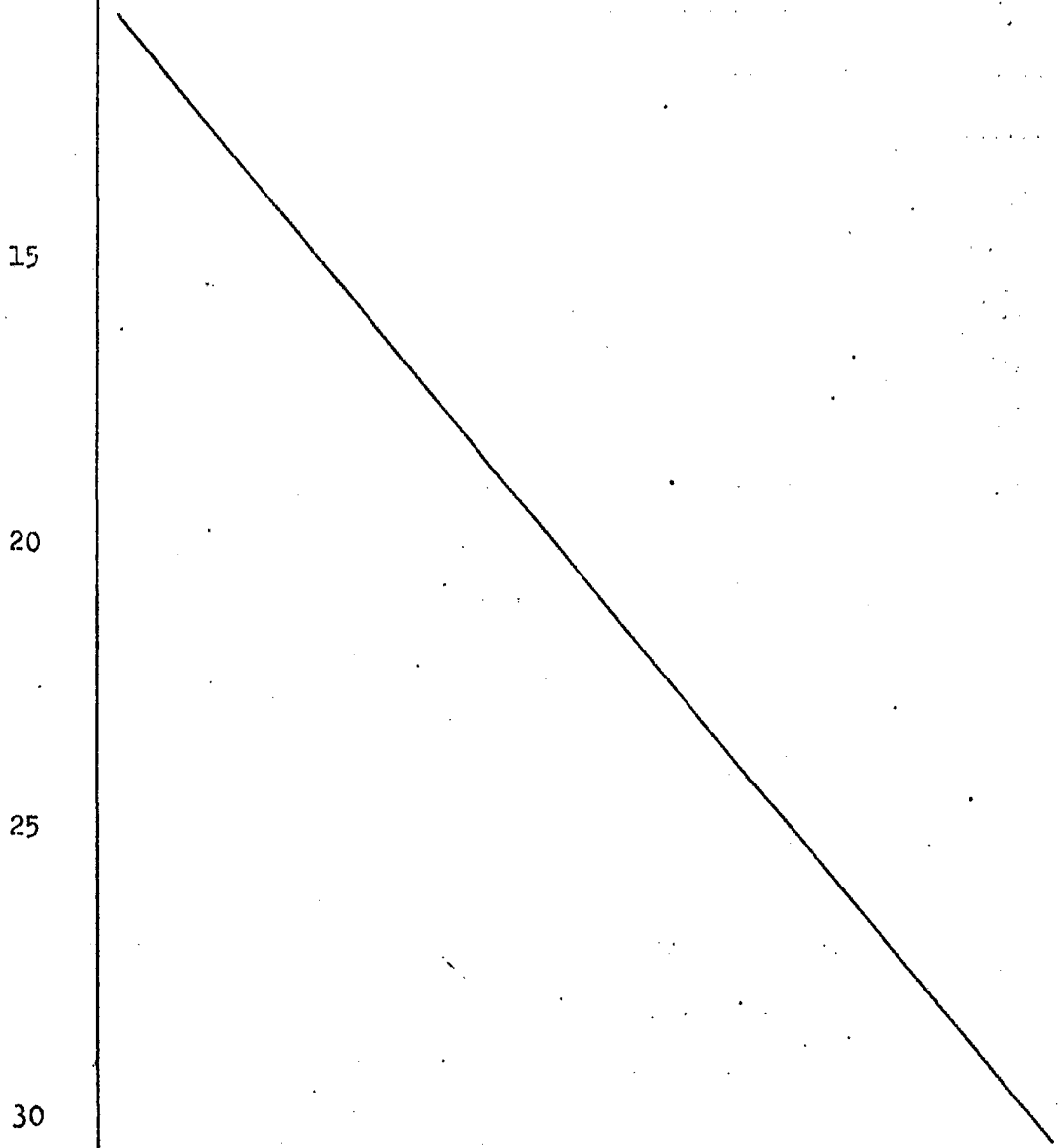
Seguidamente, el conjugado enzimático inmovilizado  
se cargó en una columna y se hizo pasar por los glóbulos con  
una solución de almidón al 30% en volumen, nombre comercial  
Maltrin-150, a un caudal de 2 ml/minuto, mientras se mante-  
25 nía la temperatura a 60°C, durante un periodo de 2 horas.  
Al final del periodo de 2 horas, se determinó la cantidad  
de glucosa formada. Se encontró que la actividad del conju-  
gado enzimático era de 695 unidades/gramo, para el caudal  
de 2 ml/minuto; definiéndose el término "unidad" como los  
30 micromoles de glucosa formados por minuto y por gramo de con

1 jugado enzimático inmovilizado.

EJEMPLO VI

5 Se repitió el experimento V, a excepción de que la enzima se purificó por medio de un método de precipitación de isopropanol, bien conocido por los expertos en la técnica. Una vez que la enzima purificada fue inmovilizada de una manera similar a la expuesta anteriormente y utilizada para convertir almidón en glucosa, se encontró que el conju

10 gado enzimático inmovilizado tenía una actividad de 852 unidades/g, para un caudal de 2 ml/minuto.



21119

1

REIVINDICACIONES

5

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

10

1ª.- Procedimiento para preparar una matriz orgánica-inorgánica, que comprende un soporte sólido, insoluble en agua, inorgánico y poroso, en combinación con un material copolímero resultante de la reacción de aminopoliestireno con un monómero bifuncional, que comprende depositar una sal de aminopoliestireno sobre un soporte sólido, desde una solución acuosa, a un pH inferior a 7 y, después, hacer reaccionar el material compuesto resultante de aminopoliestireno-soporte sólido, con un monómero bifuncional, para formar la deseada matriz orgánico-inorgánica.

15

20

2ª.- El procedimiento expuesto en la reivindicación 1ª, en el cual el pH está en un margen de 1 a 4.

3ª.- El procedimiento expuesto en la reivindicación 1ª o 2ª, en el cual la sal de aminopoliestireno es la sal de ácido clorhídrico.

25

4ª.- El procedimiento expuesto en la reivindicación 1ª o 2ª, en el cual la sal de aminopoliestireno es sal de ácido sulfúrico.

5ª.- El procedimiento expuesto en cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 4ª, en el cual el monómero bifuncional está en exceso con relación al aminopoliestireno.

30

6ª.- El procedimiento expuesto en la reivindicación

1 -1ª, que comprende tratar un soporte sólido con un monómero  
de estireno, polimerizar el material compuesto de estireno-  
-soporte sólido, en condiciones de polimerización, nitrar el  
material compuesto resultante de poliestireno-soporte sólido,  
5 do, reducir el material compuesto nitrato de poliestireno-  
-soporte sólido y, después, hacer reaccionar el material  
compuesto resultante de aminopoliestireno-soporte sólido,  
con un monómero bifuncional, para formar la deseada matriz  
orgánico-inorgánica.

10 7ª.- El procedimiento expuesto en la reivindicación  
6ª, en el cual dichas condiciones de polimerización incluyen  
una temperatura en el margen de 50 a 100°C.

15 8ª.- El procedimiento expuesto en la reivindicación  
6ª o 7ª, en el cual dicha polimerización se efectúa en pre-  
sencia de un catalizador de polimerización.

9ª.- El procedimiento expuesto en la reivindicación  
8ª, en el cual dicho catalizador de polimerización es persul-  
fato potásico.

20 10ª.- El procedimiento expuesto en cualquiera de  
las reivindicaciones 6ª a 9ª, en el cual dicha nitración se  
efectúa por tratamiento de dicho material compuesto de poli-  
estireno-soporte sólido con ácido nítrico a temperaturas in-  
feriores a la ambiente.

25 11ª.- El procedimiento expuesto en la reivindica-  
ción 10ª, en el cual dichas temperaturas están en el margen  
comprendido entre 0 y 10°C.

30 12ª.- El procedimiento expuesto en cualquiera de  
las reivindicaciones 6ª a 11ª, en el cual dicho material  
compuesto nitrato de poliestireno-soporte sólido se reduce  
por tratamiento con ditionito sódico a una temperatura ele-

1 -vada.

13<sup>a</sup>.- El procedimiento expuesto en la reivindicación 12<sup>a</sup>, en el cual dicha temperatura elevada es de 50 a 100°C.

5 14<sup>a</sup>.- El procedimiento expuesto en cualquiera de las reivindicaciones 1<sup>a</sup> a 13<sup>a</sup>, en el cual dicho soporte sólido comprende un óxido metálico.

15<sup>a</sup>.- El procedimiento expuesto en la reivindicación 14<sup>a</sup>, en el cual dicho óxido metálico es una alúmina.

10 16<sup>a</sup>.- El procedimiento expuesto en la reivindicación 15<sup>a</sup>, en el cual dicha alúmina es alúmina gamma.

15 17<sup>a</sup>.- El procedimiento expuesto en cualquiera de las reivindicaciones 1<sup>a</sup> a 13<sup>a</sup>, en el cual dicho soporte sólido es un monolito cerámico recubierto con un óxido metálico poroso.

18<sup>a</sup>.- El procedimiento expuesto en cualquiera de las reivindicaciones 1<sup>a</sup> a 13<sup>a</sup>, en el cual dicho soporte sólido es una sílice porosa.

20 19<sup>a</sup>.- El procedimiento expuesto en cualquiera de las reivindicaciones 1<sup>a</sup> a 18<sup>a</sup>, en el cual el monómero bifuncional es aldehído glutárico.

20<sup>a</sup>.- "PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR UNA MATRIZ ORGANICA-INORGANICA".

25 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, y con los fines que se han especificado.

30

1

Esta Memoria consta de treinta y seis hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 29.NOV.1979

P.A.

5

Oscar de Elvira  
Por Poder

10

15

20

25

30

21119

MTG